

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1943

THESE

N°

292

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Jean BACHELET

Né le 11 Novembre 1914, à Rully (Saône-et-Loire).

Présentée et soutenue publiquement le 30 JUIN 1943 19

RECHERCHES SUR LES AGGLUTININES
DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE

Président : M. LOEPER, Professeur.

PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, rue Deparcieux, 29

1943

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1943

THESE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ETAT)

par

Jean BACHELET

Né le 11 Novembre 1914, à Rully (Saône-et-Loire).

Présentée et soutenue publiquement le 19

**RECHERCHES SUR LES AGGLUTININES
DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE**

Président : M. LOEPER, Professeur.

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, rue Deparcieux, 29
1943



I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIERE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	GASTINEL.
Parasitologie et histoire naturelle médicale....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CHABROL.
Pathologie chirurgicale	PETIT-DUTAILLIS.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	AUBERTIN.
Hygiène et médecine préventive.....	TANON.
Médecine légale	DUVOIR
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	LIAN.
Pathologie expérimentale et comparée	Henri BENARD.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	ABRAMI.
Clinique médicale	FIESSINGER.
	HARVIER.
	P.-VALLERY-RADOT.
	CATHALA.
	Robert DEBRE.
Hygiène et clinique de la première enfance....	LEVY-VALENSI.
Clinique des maladies des enfants.....	GOUGEROT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	GUILLAIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	LEMIERRE.
Clinique des maladies du système nerveux.....	CADENAT.
Clinique des maladies infectieuses	MONDOR.
Clinique chirurgicale	QUENU.
	BROCQ.
Clinique ophtalmologique	VELTER.
Clinique urologique	CHEVASSU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	LEVY-SOLAL.
	PORTES.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie ...	LEVEUF.
Clinique thérapeutique médicale	LOEPER.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	SENEQUE.
Clinique propédeutique	M. VILLARET.
Clinique de la Tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique	MATHIEU.
Clinique de cardiologie	DONZELOT.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance Médico-sociale	N...
	DOGNON.
	GIROUD.
	HAZARD.
Professeurs sans chaire	JAYLE.
	JOANNON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.		MM.	
AMELINE	Pathologie chirurgicale.	HAGUENAU	Pathologie médicale.
BARIETY	Pathologie médicale.	LACOMME	Obstétrique.
BERNARD (Etien.)	Pathologie médicale.	LANTUEJOUL	Obstétrique.
BESANÇON Justin.	Hydrologie.	LAVIER	Parasitologie.
BONNET	Bactériologie.	LELONG	Pathologie médicale.
BOULIN	Pathologie médicale.	LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
BROUET	Pathologie médicale.	LENEGRE	Pathologie médicale.
BULLIARD	Histologie.	Mlle J. LEVY	Pharmacologie.
CACHERA	Pathologie médicale.	MARCHAL	Pathologie médicale.
CORDIER	Anatomie.	MENÉGAUX	Pathologie chirurgicale.
COSTE	Pathologie médicale.	MOLLARET	Pathologie médicale.
COUVELAIRE (Roger)	Urologie.	MOUQUIN	Pathologie médicale.
DELARUE	Anatomie pathologique.	PATEL	Pathologie chirurgicale.
DELAY	Pathologie médicale.	N... ..	Pathologie chirurgicale.
DEGREZ (H.)	Physique.	RENARD	Ophtalmologie.
DESOILLE	Médecine légale.	RICHET	Physiologie.
DIGONNET	Obstétrique.	N... ..	Pathologie chirurgicale.
DOGNON	Physique.	SICARD	Pathologie chirurgicale.
FEVRE	Pathologie chirurgicale.	SOULIE	Pathologie médicale.
FUNCK-BRENTANO	Pathologie chirurgicale.	SUREAU	Obstétrique.
GALLIARD	Parasitologie.	TURPIN	Pathologie médicale.
GARCIN	Pathologie médicale.	WILMOTH	Pathologie chirurgicale.
Mlle GAUTHIER-			
VILLARS	Anatomie pathologique.		
DE GENNES	Pathologie médicale.		

III. — AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.		MM.	
ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.	HUGUENIN	Anatomie pathologique.
CHAILLEY-BERT .	Physiologie.	LE LORIER	Obstétrique.
GUENIOT	Obstétrique.	NEVEU-LEMAIRE .	Parasitologie.
HEITZ-BOYER	Pathologie chirurgicale.	PIEDELIEVRE	Médecine légale.
		VAUDESCAL	Obstétrique.

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS
DE CLINIQUE ANNEXE
A TITRE PERMANENT

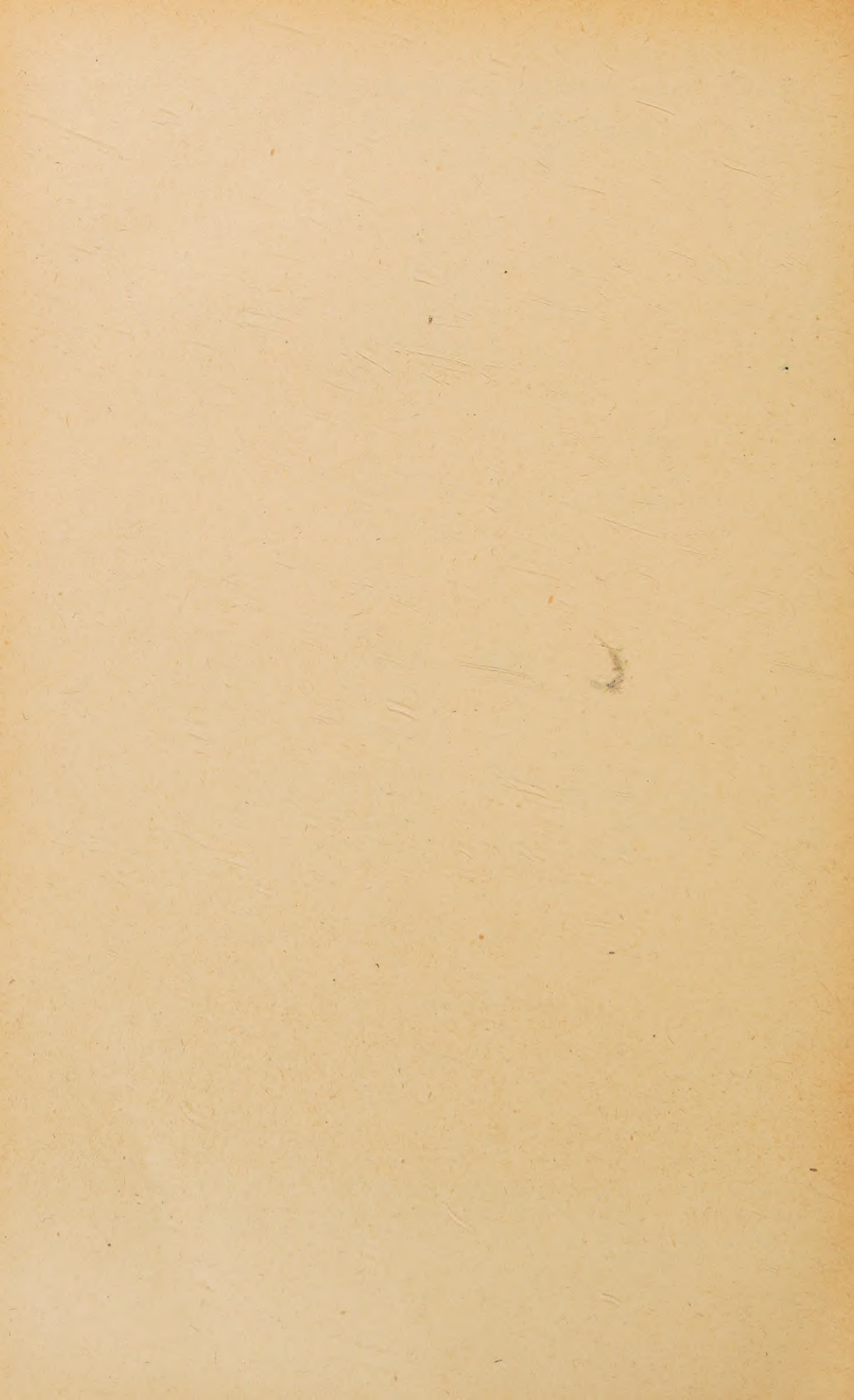
MM.		MM.	
ALAJOUANINE ..	} Clinique médicale	BASSET	} Clinique chirurgicale.
BRULE		GATELLIER	
CHEVALLIER ..		DE GAUDART ..	
LAROCHE Guy ..		D'ALLAINES ..	
MOREAU		MOULONGUET ..	
SEZARY		MOURE	

MM.	
ECALLE	} Clinique obstétricale.
VIGNES	

V. — CHARGES DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
DECHAUME	Stomatologie.
N... ..	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

(Mort pour la France)

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MA FEMME

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON PRESIDENT DE THESE
MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE LOEPER

Professeur de Clinique Médicale
Membre de l'Académie de Médecine
Médecin de l'Hôpital Saint-Antoine
Commandeur de la Légion d'Honneur

*Avec l'expression de ma respec-
tueuse gratitude pour l'honneur
qu'il a bien voulu me faire en ac-
ceptant la présidence de cette thèse.*

A MONSIEUR MAURICE DOLADILHE

Docteur ès sciences

Chef de travaux de physique

à la Faculté des Sciences de Dijon

*En témoignage de ma profonde
reconnaissance.*

*Il me fournit l'idée de ce travail
au cours duquel il me guida pas à
pas avec un grand talent et une
extrême bienveillance.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR ANDRÉ VARAY

Ma dette est double envers lui.

*Il me prodigua ses soins au
cours de ma maladie en 1939.*

*Il m'accueillit à mon arrivée à la
Faculté de Paris.*

A MES MAITRES DE L'ECOLE DE MEDECINE
ET DES HOPITAUX DE DIJON

AVANT-PROPOS

Au cours du mois d'octobre 1940, alors que nous étions interne à l'hôpital psychiatrique de la Chartreuse de Dijon, le docteur ROYET, médecin des hôpitaux psychiatriques, nous fournissait l'idée d'une thèse sur la répartition des groupes sanguins dans les maladies mentales.

Ce travail devait être abandonné en cours d'exécution, la bibliographie exclusivement étrangère étant introuvable dans les circonstances actuelles; les correspondances entre hôpitaux étant difficiles, notre départ d'un service de maladies mentales en furent les différentes raisons.

Intéressé au cours de ces quelques travaux par la recherche des groupes sanguins (effectuée sur environ 800 malades), nous fûmes amenés au cours des discussions quotidiennes avec M. le professeur DOLADHILE, discussions qui naissaient de la technique de recherche des groupes sanguins (technique de Beth-Vincent), tel qu'agglutination tardive, peu nette, à approfondir la question des agglutinés. D'autant plus qu'à notre connaissance, aucune recherche n'a été faite sur la localisation des anticorps agglutinants.

Abstrait dans sa matière, notre travail se donnait un but pratique : préparer des sérums tests aussi purs et aussi fidèles que possible pour les déterminations de groupes sanguins.

Nous nous sommes efforcés d'apporter notre modeste contribution à ce chapitre de la science; nous ne prétend-

drons pas conclure, nos expériences doivent être reprises en grand pour chaque anticorps. Là n'était pas notre but, mais le problème posé est d'importance, pour nous, médecins.

Déterminer la localisation des anticorps sur les différents éléments constituant le sérum sanguin; obtenir une extraction anaphylactiquement inerte et riche en anticorps protecteurs, ouvrirait une voie nouvelle à la sérothérapie.

Nous nous sommes spécialement attachés à la recherche de la localisation de l'agglutinine du sérum hémolytique.

Les séparations ont été effectuées par M. DOLADILHE dans son laboratoire de l'Institut d'Hygiène de Dijon; nos mesures ont été effectuées sur de nombreux sérum : hémolytique, anti-mouton, anti-humain.

INTRODUCTION

Les recherches effectuées depuis de nombreuses années pour isoler les constituants du sérum sanguin n'ont fourni que des résultats peu satisfaisants.

Aucun progrès sensible n'a été fait depuis les travaux d'HOFMEISTER (1888), de MARCUS EMIL (1899) et de FORGES, SPIRO et FULD (1900).

On considère encore comme constituants sériques fondamentaux les protéines complexes isolées par ces auteurs.

1° La définition actuelle de l'euglobuline ne s'applique cependant qu'à une fraction de cette protéine complexe.

2° Cette protéine, séparable du sérum par une méthode très simple, est formée par l'association de deux autres protéines : l'homoglobuline et la protéine visqueuse, qui se différencient très nettement par leurs propriétés anaphylactisantes.

Mais pour la clarté de l'exposé nous allons réviser rapidement les principales méthodes de fractionnement connues.

Depuis que PANUM a démontré, en 1851, la possibilité scinder l'édifice colloïdal du sérum sanguin, de nombreux chercheurs se sont efforcés de fractionner les constituants sériques.

Les méthodes employées sont diverses mais peuvent cependant se classer en quelques groupes bien définis. L'histoire du fractionnement gagne en clarté si l'on

expose les résultats fournis par chacune des méthodes, plutôt que l'énumération par dates des divers travaux.

a) La première méthode a été instituée par PANUM. Elle consiste à rompre l'équilibre colloïdal par l'addition, au sérum, d'eau distillée. Sous cette influence, le sérum se trouble et le précipité devient plus important si l'on renforce l'action de l'eau par l'acide acétique.

PANUM arrive à cette conclusion qu'il existe deux groupes protéosériques :

1° Celui qui précipite par dilution d'eau distillée ou légèrement acidifiée par l'acide acétique et qu'il dénomme la sérum-caséine.

2° Celui qui reste en solution dans ces conditions. Alex. SCHMITT, qui croyait que le sérum-caséine provenait des éléments histologiques du sang en voie de coagulation, lui donne, en 1862, le nom générique de globuline.

Confirmant les résultats de PANUM et acceptant l'appellation d'Alex. SCHMITT, HOPPE-SEYLER et Th. WEYL signalent, en 1877, que l'acide carbonique peut remplacer l'acide acétique. DIACONO applique ces résultats dans un travail très intéressant sur les caractères de la globuline précipitée des sérums hémolytiques par les solutions d'acide carbonique.

L'équilibre colloïdal qui existe au sein du sérum est donc rompu par addition d'eau distillée ou légèrement acidulés.

DOLADHILE a montré que ce sont les ions H libres des solutions acidulées qui provoquent la précipitation de la globuline. Après avoir mis en évidence les caractères communs des protéines précipitées par les divers acides, cet auteur propose qu'on leur donne le nom générique d'acido-globulines.

b) La deuxième méthode à signaler dans l'historique des procédés de séparation des séro-protéines est l'utilisation de la floculation au moyen de solutions salines.

L'utilisation du pouvoir précipitant des sels neutres

apporte, en effet, un sérieux moyen d'études des liquides organiques et de séparation des principales substances protéiques qu'ils contenaient. Cette méthode a permis, en particulier, de considérer le sérum comme constitué par deux groupes de protéines : les *globulines* et les *albumines*.

Pour ce faire, un grand nombre de sels ont été préconisés. Le sulfate d'ammonium, utilisé primitivement par HOFMEISTER, qui, en 1888, introduisit cette méthode en sérologie, semble occuper la première place.

Ce sel exerce, en effet, sur les protéines sériques, une action précipitante très énergique, et HOFMEISTER et KAUDER appliquent cette propriété à la séparation des constituants sériques, en montrant d'abord qu'ils ne sont pas modifiés sensiblement par la précipitation. Cette précipitation s'effectue en deux zones : l'optimum de la première a lieu pour une concentration du sulfate d'ammonium égale à la moitié de la saturation; celui de la deuxième zone se produit quand ce sel atteint la saturation.

Ce fait permet donc de séparer facilement les protéines sériques en deux groupes : celui que précipite le sulfate d'ammonium à demi-saturation a reçu le nom de *globuline*; l'autre a été dénommé *albumine*.

Les travaux d'HOFMEISTER et de KAUDER ne tardèrent pas à être confirmés par ceux de POHL, FORGES, SPIRO et FULD qui, ainsi que nous le verrons au chapitre suivant, définissent d'autres concentrations du sulfate d'ammonium permettant de distinguer des constituants sériques.

Le sulfate d'ammonium n'est pas le seul sel employé. D'après PINKS, le sulfate de sodium possède le même pouvoir précipitant que celui d'ammonium, à condition d'opérer à 30°, et présente, entre autres avantages, celui d'être non toxique et de permettre le dosage direct de l'azote par le procédé KJELDAHL dans les protéines isolées.

HAMMARSTEN démontre que les sels à anion monovalent ne précipitent pas à saturation la même fraction que

le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Cette floculation serait moins avancée avec le sulfate de magnésium qui, à saturation, précipiterait la même fraction que le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

La méthode de fractionnement sérique par floculation au moyen des solutions salines a rendu, par la découverte d'HOFMEISTER, d'immenses services en sérologie. Les définitions des constituants du sérum, encore admises aujourd'hui, résultent de ces recherches.

c) Depuis que GRAHAM a introduit la notion de dialyse en biologie, les auteurs ont cherché à mettre à profit cette propriété pour déminéraliser les sérums.

Depuis longtemps, il a été reconnu, en outre, que le sérum se trouble quand on le soumet à la dialyse; la protéine qui précipite dans ces conditions représente une fraction seulement de la globuline : l'euglobuline, comme l'a définie MARCUS EMIL; la fraction qui reste dans le dialysat a reçu le nom de pseudo-globuline.

HAMMARSTEN a démontré que la fraction qui précipite, par dialyse directe, est moins abondante que celle qui précipite, par dialyse des globulines préalablement floculées par le sulfate de magnésium à saturation, et s'en tient à la différenciation proposée par HOFMEISTER et KAUDER en globuline et en albumine.

La dialyse simple, même avec eau fréquemment renouvelée, est longue. PIETTRE signale l'inconvénient de cette lenteur qui expose les produits sériques aux rapides altérations microbiennes et préconise la dialyse sucrée ou glycinée qui permet d'extraire rapidement du sérum la majorité de l'eau et des substances minérales.

Cependant, cet auteur n'a pas appliqué cette méthode à la séparation des constituants sériques.

Quoi qu'il en soit, la dialyse simple de MARCUS EMIL a permis la division de la globuline d'HOFMEISTER en deux constituants : l'euglobuline et la pseudoglobuline, faisant naître, comme nous le verrons plus loin, un grand

espoir chez les immunologistes, puisque l'anticorps se concentre en majeure partie sur la deuxième de ces fractions sériques.

d) Pour accroître la déminéralisation effectuée d'une manière incomplète, malgré tout, par la dialyse, on eut recours à l'emploi du champ électrique.

PAULY désigne sous le nom d'électro-dialyse l'entraînement des électrolytes à travers une paroi poreuse par le courant électrique.

Ce procédé, étudié d'une manière particulièrement féconde, par DHERE, permet de déminéraliser le sérum en beaucoup moins de temps et d'une manière plus poussée qu'avec la dialyse simple. HEYMANN admet que le rendement est 168 fois plus grand.

En appliquant sa méthode à un sérum déjà dialysé, DHERE obtient la précipitation de l'euglobuline et d'une fraction de pseudoglobuline. Son dispositif est ainsi conçu : deux électrodes en platine sont placées au-dessous d'un tube en U renversé plein de liquide sérique, et dont les ouvertures, fermées par une membrane de collodion, plongent dans l'eau distillée, fréquemment renouvelée.

Ce procédé ne permet cependant pas une déminéralisation parfaite. Ainsi DHERE signale, qu'après une opération de 26 heures dans les conditions précédentes, la conductivité d'un sérum de cheval était réduite de 91×10^6 à $10,5 \times 10^6$ mohs-cm.

e) Une étape importante a été franchie en sérologie par la méthode de PIETTRE, basée sur la déminéralisation et la déshydratation d'un sérum par l'acétone.

Cet auteur montre que les lipides ont une influence très remarquable sur la stabilité des protéines, et croit pouvoir soupçonner, dans ce fait, les difficultés de la séparation des protéines sériques par la méthode aux sels.

Deux conditions essentielles doivent, d'après PIETTRE, être réalisées pour obtenir une séparation presque com-

plète des protéines du sérum : l'élimination des substances minérales d'abord, l'extraction des lipides ensuite. La solution la plus avantageuse et la plus simple, paraît être de traiter directement le sérum, après neutralisation préalable de son alcalinité par des solvants organiques capables à la fois de flocculer la totalité des substances protéiques, tout en maintenant, en solution, les lipides et les substances minérales.

L'acétone parut, pour PIETTRE, le solvant organique de choix, supérieur à l'alcool, et c'est alors qu'il institua la méthode de l'acétone que nous rappellerons brièvement.

La précipitation totale des protéines s'effectue en ajoutant à un volume donné de sérum, 2 fois $1/2$ son volume d'acétone et en refroidissement énergiquement.

Après filtration et essorage on obtient une masse protéinique craquelée qu'on lave plusieurs fois à l'acétone d'abord, puis à l'éther séché sur le carbonate neutre de sodium ensuite; après quoi, on dissout dans l'eau distillée.

La sérum-globuline est précipitée de cette solution en amenant le milieu à un pH convenable à l'aide d'HCL N/100, la détermination de l'optimum de floculation s'effectuant par tâtonnement. La globuline séparée et lavée par centrifugation est prête pour l'étude.

Une protéine que PIETTRE pense n'être ni de la globuline, ni de l'albumine, et qu'il nomme : myxoprotéine, est précipitée de la liqueur débarrassée de globuline par addition de son volume d'acétone à 0° . Trois précipitations au moins sont d'ailleurs nécessaires pour séparer la totalité de la myxoprotéine que l'on reprend par l'eau dans laquelle elle est insoluble.

Quand l'acétone ne donne plus trace de résidu à la reprise par l'eau, la liqueur ne contient que de l'albumine que l'on obtient en de belles écailles blondes en séchant le liquide sur vide sulfurique.

La méthode de PIETTRE introduit un nouveau constituant sérique en biologique : la myxoprotéine. Nous verrons à quel point il peut être individualisé en étudiant ses propriétés. Disons tout de suite que la méthode PIETTRE a marqué une étape nouvelle dans l'étude des constituants sériques en permettant d'isoler la myxoprotéine.

f) Nous terminerons cette rapide revue des principaux procédés de fractionnement sérique utilisés à ce jour, en disant deux mots d'une dernière méthode utilisée par DOLADILHE et MAZILLE : il s'agit d'une séparation des protéines par dialyse et acidification.

La déminéralisation d'un sérum sanguin modifie la stabilité de ses protéines, et lorsque cette déminéralisation est obtenue par dialyse contre eau distillée, une partie des protéines précipite; c'est l'euglobuline de MARCUS EMIL.

Nous montrerons plus loin que la quantité d'euglobuline, que la dialyse déséquilibre, ne dépend pas uniquement du degré de déminéralisation, mais de la concentration en ions hydrogène du dialysat.

L'action déminéralisante de la dialyse est toujours limitée. En prenant comme critérium de déminéralisation simple le moment où il ne passe plus d'ions CL à travers le septum, on peut priver ensuite, par floculation, le sérum de la totalité de la fraction sérique sensibilisée aux ions hydrogène et constater que, soumis à de nouvelles dialyses, il ne passe plus de protéines sensibles aux ions H. Nous verrons que la partie de la globuline qui, précipitée, renferme l'euglobuline de MARCUS EMIL et nous proposerons d'appliquer la dénomination d'euglobuline à cette protéine.

Le sérum dialysé et privé de la fraction sensibilisée aux ions hydrogène précipite encore par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Il renferme donc la globuline telle que le définit HOFMEISTER. Enfin débarrassé de la globuline, le sérum peut être considéré comme une solu-

tion d'albumine puisqu'il floccule par le sulfate d'ammonium à saturation.

L'euglobuline ainsi préparée se comporte différemment vis-à-vis des solutions isotoniques de NaCl — suivant qu'elle est agitée ou simplement mise en contact.

Alors que dans le premier cas on observe une solubilité totale, dans le deuxième, on assiste à une véritable transformation de la protéine qui blanchit et amorphe, passe à la couleur jaune ambrée, à l'état visqueux translucide, tandis qu'une partie de l'euglobuline a diffusé dans le liquide isotonique.

Cette observation a été le point de départ de la dissociation par DOLADILHE de la globuline en deux constituants : l'un très diffusible dans l'eau physiologique : l'homoglobuline; l'autre très peu diffusible : la protéine visqueuse.

Nous allons avoir l'occasion d'insister longuement sur ces deux constituants.

Telles sont les principales méthodes de fractionnement qui ont été utilisées dans l'étude des sérums. Nous remarquerons que la méthode aux sels mise à part, elles ont toutes en vue une déminéralisation préalable du sérum : par dilution (PANUM), par dialyse (MARCUS EMIL), par électrodialyse (DHERE), par précipitation acétonique (PIETTRE). Contentons-nous de signaler ce fait pour l'instant.

CHAPITRE PREMIER.

HISTORIQUE DE LA PROTEINE VISQUEUSE ET DE L'HOMOGLOBULINE

En 1936, DOLADILHE constate que le précipité d'euglobuline obtenu par la méthode de MARCUS EMIL se décompose au contact de l'eau physiologique. Voici comment il opère : il dialyse du sérum contre de l'eau distillée. L'euglobuline précipite. Lorsque l'eau de dialyse ne contient plus d'ions CL, il sépare le précipité par une centrifugation prolongée et à grande vitesse (6.000 tours à la minute). Sur le culot de centrifugation fortement adhérent au tube il verse avec précaution un peu d'eau physiologique et laisse au repos. Au bout de 10 à 20 minutes on voit le précipité changer d'aspect. De blanc et opaque qu'il était, il devient jaune et translucide. Cette transformation va progressivement du sommet à la base. Au bout d'une heure ou deux on obtient un culot entièrement jaune et translucide formé d'une substance visqueuse. Dans l'eau physiologique, on note la présence d'une protéine (précipitation acétonique, ou acide trichloracétique). Tout s'est passé comme si l'euglobuline s'était divisée au contact de l'eau salée en deux constituants : l'un diffusible, l'autre non diffusible. Le premier a été nommé homoglobine, le second protéine visqueuse en raison de sa consistance.

Reprenant ces recherches, MAZILLE, en 1937, essaye de différencier ces deux constituants et montre, par l'ana-

lyse anaphylactique, que l'homoglobuline est inerte au point de vue anaphylactique; alors que la protéine visqueuse possède tous les caractères anaphylactisants de l'euglobuline dont elle provient. L'électro-dialyse montre bientôt à DOLADILHE que la pseudo-globuline est aussi constituée comme l'euglobuline, par deux constituants analogues qu'il dénomme jusqu'à plus ample informé : protéine visqueuse et homoglobuline. Comme ceux de l'euglobuline ils se différencient anaphylactiquement. Tous les caractères anaphylactisants de la pseudo-globuline étant concentrés dans sa fraction visqueuse. MAZILLE enfin, s'attaque au sérum complet et, se demandant si la totalité des protéines sériques ne sont pas constituées par de l'homoglobuline et de la protéine visqueuse. On essaye donc de séparer le bloc des protéines sériques en ces deux fractions. Il avait été conduit à émettre cette hypothèse par une remarque de DOLADILHE qui n'a pas été publiée et par laquelle cet auteur avait noté que l'albumine était constituée par une petite quantité de protéine visqueuse unie à une grande quantité d'homoglobuline.

Le principe de la séparation de la protéine visqueuse de la globuline s'était révélé actif jusqu'ici, était l'électrodialyse. Il semblait donc qu'il faille déminéraliser le sérum pour que cette protéine unie à son homoglobuline puisse être complètement précipitable par les ions hydrogène. Aucune déminéralisation effectuée ainsi ne permettait cependant de précipiter du sérum, la totalité de la protéine visqueuse. Entre parenthèse, cette protéine visqueuse contenue dans l'albumine expliquerait pourquoi elle est anaphylactisante.

MAZILLE s'est donc attaché à mieux déminéraliser le sérum que ne pouvait le faire la simple électrodialyse.

Pour cela, il s'est efforcé de fixer la totalité des ions dans des combinaisons irréversibles. Il s'agissait de fixer surtout les ions chlore et les ions Na. Pour les ions chlore, il a eu l'idée de les fixer sous forme de chlorure de plomb,

et pour les ions Na, sous forme d'amalgame avec le mercure.

C'est alors qu'il s'aperçut que la totalité de la protéine visqueuse précipite, et que le surnageant est constitué par une protéine très semblable à l'homoglobuline.

Pour se permettre une telle conclusion, l'auteur s'appuie sur l'anaphylaxie; la protéine visqueuse est anaphylactisante, elle possède tous les caractères du sérum complet; le surnageant est, comme l'homoglobuline, de la globuline absolument inerte au point de vue anaphylactique. Non seulement elle ne déclenche pas le choc chez un cobaye préparé par elle-même, par la protéine visqueuse ou par le sérum complet, mais elle est incapable de sensibiliser un cobaye à une injection d'épreuve de sérum complet, de protéine ou d'homoglobuline.

Il semble donc bien que les protéines sériques se divisent par cette nouvelle méthode de fractionnement en deux fractions, l'une visqueuse : la protéine visqueuse; l'autre non visqueuse : l'homoglobuline.

CHAPITRE II.

METHODE DE SEPARATION DE LA PROTEINE VISQUEUSE ET DE L'HOMOGLOBULINE PAR DIALYSO-ELECTROLYSE

TECHNIQUE - MONTAGE

Lors de nos premières expériences, nous procédions de la manière suivante :

Le sérum, préalablement dialysé jusqu'à ce qu'il ne passe plus d'ions chlore, était placé dans un cornet de parchemin plongeant dans un vase d'eau distillée dans lequel se trouvait l'anode en plomb. La cathode était constituée par un bain de mercure également en contact avec les sérums par l'intermédiaire d'une membrane en parchemin. L'intensité du courant, réglé par une boîte de résistance, ne dépassait pas 2 milli-ampères.

Dans ces conditions, pour un volume de liquide de 10 cc., l'opération durait environ 1/2 heure. La protéine visqueuse avait un aspect ambré, mais teinté de blanc. Elle était soluble dans l'eau physiologique et conservait ses caractères immunologiques. Mais nous avons constaté que le surnageant était, quelquefois, anaphylactisant. Les chocs produits, bien que larvés, n'autorisaient pas une conclusion formelle.

Corrélativement, nous constatons la présence de protéine visqueuse dans le surnageant.

Un examen attentif nous a permis de nous rendre compte, au cours de l'opération, que le voisinage de la cathode accusait un pH pouvant atteindre quelquefois 8.

Nous avons alors pensé que la combinaison des ions avec le mercure était limitée par la résistance au passage que leur offrait le septum dialyseur. La fraction de ces ions, empêchés de se combiner au mercure, donne de la soude qui, en présence des traces d'acide chlorhydrique, se trouve ainsi rapidement en contact avec un milieu chloruré sodique; il se comporte alors comme l'a indiqué DOLADILHE dans sa méthode de séparation de protéine visqueuse et de l'homoglobuline.

C'est à la suite de ces observations que nous avons institué notre dialyso-électrolyse, en supprimant l'eau dans laquelle plongeait l'anode.

Après de longs tâtonnements, nous avons déterminé une intensité assez forte qui limite le temps de l'opération à 2 minutes, sans dénaturer les protéines.

LASCH et REITSTOTTER avaient déjà signalé, d'ailleurs, l'utilité de courants très puissants, car les faibles n'ont aucune action sur la purification des sérums.

Ceci dit, voici comment nous effectuons la dialyso-électrolyse irréversible :

Nous avons tout d'abord employé un tube en U évasé à une de ses extrémités. Le sérum dialysé était placé dans la branche correspondant à l'extrémité évasée et reposait sur une nappe de mercure constituant la cathode. L'anode était une spirale de plomb recouverte de colloïdion. Nous opérons maintenant de la manière suivante :

Le dialyso-électrolyseur est constitué par une cuve contenant du mercure qui joue le rôle de cathode et une anode de plomb. Le sérum déjà dialysé contre eau distillée, c'est-à-dire privé de tous ses électrolytes libres, est versé sur le mercure. L'anode de plomb plonge dans le sérum. La source de courant est constituée par une bat-

terie d'accumulateurs de 80 volts, un milliampèremètre indique l'intensité qu'un rhéostat permet de régler.

TECHNIQUE. — Cinq centimètres cubes de sérum déjà dialysés sont versés sur la nappe de mercure; on y plonge l'électrode de plomb et on règle l'intensité à 20 milliam-pères environ. On assiste alors à la précipitation de la protéine visqueuse sous forme d'un manchon qui adhère fortement au cylindre de plomb en même temps que l'intensité du courant baisse progressivement. Cette baisse de l'intensité se continue pendant quelques minutes, puis s'arrête. A ce moment, toute la protéine visqueuse est précipitée. L'électrolyse est terminée.

On retire l'électrode de plomb, ce qui permet d'isoler la protéine visqueuse qu'on reprend alors par l'eau physiologique. Le liquide restant dans le dialyso-électrolyseur est incolore et constitue l'homoglobuline. On purifie par dialyse les solutions de protéine visqueuse et d'homoglobuline pour en enlever toutes les traces de sels de plomb.

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES DEUX CONSTITUANTS.

L'étude comparative des propriétés physiques des deux fractions sériques isolées par dialyso-électrolyse est un problème colloïdal. Nous emprunterons à MAZILLE les conclusions suivantes :

La floculation, ou plus exactement l'évolution spontanée vers la floculation, montre qu'il y a entre eux une différence indéniable de stabilité :

La protéine visqueuse en solution isotonique ou aqueuse, évolue visiblement vers la floculation. La fraction liquide, en milieu isotonique ou aqueux, conserve une stabilité quasi-parfaite.

De même les phénomènes de sensibilisation et de protection d'une floculation par l'addition de traces d'un col-

loïde étranger, constituent une des méthodes les plus sensibles de différenciation physique. On sait, en effet, que des quantités souvent très faibles de certaines substances colloïdales suffisent pour modifier le comportement d'un colloïde vis-à-vis d'un électrolyte.

Cette influence, qui peut être activante ou protectrice, semble être conditionnée, en grande partie au moins, par la constitution physique du colloïde.

Or la protéine visqueuse, modère, ralentit le déséquilibre du colloïde. La substance contenue dans la partie liquide n'exerce aucune action.

MAZILLE rappelle que HO DAC AN a montré que les matières colorantes n'exercent sur les protéines sériques une action visible in-vitro ou in-vivo que si elles sont de nature colloïdales, formées de granules électro-positifs et si leur concentration dans le sérum est suffisante pour provoquer la floculation de ses colloïdes. Les phénomènes qui suivent l'addition du colorant au sérum traduisent donc la floculation mutuelle des granules colorantes et des granules protéiques. Et MAZILLE conclut : in-vitro une matière colorante colloïdale électro-positive ou électro-négative, introduite dans un sérum sanguin, se fixe électivement sur le constituant visqueux de l'édifice protéique.

Et voici un point d'importance pratique considérable pour le médecin, que DOLADILHE a mis en évidence :

Les deux constituants que nous séparons sous l'influence du champ électrique coexistent dans le sang circulant.

La gélification irrétractile du plasma sanguin, mise au point pour le cobaye, par DOLADILHE, fournit une preuve satisfaisante. On sait, en effet, que le sang recueilli à la sortie de l'organisme dans un milieu hypertonique est incoagulable. Privé de ses globules rouges par centrifugation et soumis à la dialyse contre eau distillée, le

plasma se prend brusquement en un gel irrétractile au moment où la concentration saline est rendue optima par la dialyse.

Ce gel contient des substances emprisonnées dans ses mailles qui peuvent s'échapper par diffusion lorsqu'on immerge ce gel dans l'eau distillée ou dans une solution saline.

Ces substances contiennent l'alexine.

Quelques expériences faites par l'auteur sur l'immun-plasma hémolytique de cheval montrent que l'hémolysine diffuse avec elle. Soumettons le sang du cobaye à la gélification irrétractile et traitons la solution provenant de l'immersion du gel par dialyso-électrolyse.

Il est curieux de constater le comportement de cette solution. Aucune similitude avec le sérum total. Pas de dépôt apparent de protéine visqueuse. Elle se comporte comme l'électro-dialysat privé déjà de sa protéine visqueuse.

Les substances spontanément diffusibles hors du gel, c'est-à-dire non spontanément gélifiables, se comportent donc à la dialyso-électrolyse comme celles qui se maintiennent dans la partie liquide.

Ce phénomène qui fait l'objet de recherches en cours, devait être rapproché de nos résultats. Il est curieux que le plasma libre, sous des influences physiques aussi douces qu'une hypertonisation, des constituants sériques analogues à ceux que libère le courant électrique.

Signalons enfin que les premières expériences d'anaphylaxie auxquelles nous avons procédé, ont montré que dans quelques cas, la solution des substances diffusibles et non gélifiables est inerte.

Ce deuxième rapprochement est également intéressant.

DIFFÉRENCIATION ANAPHYLACTIQUE DES DEUX CONSTITUANTS

La dialyso-électrolyse scinde donc l'édifice colloïdo-sérique en deux fractions, l'une solide, l'autre liquide. La fraction solide présente les caractères physiques distinctifs de la protéine visqueuse. DOLADILHE et MAZILLE ont montré récemment par des séries très complètes d'expériences qu'elle en présente aussi les propriétés anaphylactiques.

La deuxième fraction, qui se présente comme une solution parfaitement limpide, contient une certaine proportion de substance solide dont la nature protéique vient d'être démontrée au chapitre précédent.

Avant d'exposer les résultats fournis par l'analyse anaphylactique, signalons un fait extrêmement curieux qui, à lui seul, suffit à montrer que ces protéines sont tout à fait différentes de la protéine visqueuse.

Soumise à la dialyso-électrolyse, la deuxième fraction se trouble rapidement et les protéines précipitent en totalité. Le phénomène est tout à fait différent de celui que présente l'extraction de la protéine visqueuse; les protéines n'adhèrent pas du tout à l'anode de plomb, mais flocculent en tourbillonnant, puis sédimentent sous la forme d'une poudre blanche, opaque, parfaitement soluble dans les solutions salines.

Cette observation faite par MAZILLE au début de ses recherches sur la dialyso-électrolyse a été une des raisons les plus puissantes du bien-fondé de son hypothèse. L'analyse anaphylactique en apporte d'ailleurs une confirmation éclatante et définitive.

Les protéines contenues dans la fraction liquide sont indéniablement différentes de celles qui constituent la fraction solide. Précisons, résultat capital des travaux de DOLADILHE et MAZILLE, qu'elles ne contiennent pas traces de la protéine solide décelable par l'anaphylaxie,

atteignant ainsi un degré de purification jusqu'ici inconnu.

Avant d'admettre un tel résultat, DOLADILHE et MAZILLE ont procédé à de très nombreuses expériences anaphylactiques.

Chaque série comprenait, au moins, une dizaine d'expériences qui étaient, naturellement, effectuées sur des produits provenant d'une nouvelle séparation.

Voici déjà les résultats donnés par la fraction liquide.

Celle-ci est totalement dépourvue de propriétés anaphylactiques, elle ne déclanche jamais le choc chez un cobaye préparé par le sérum complet ou par la protéine visqueuse, alors que le sérum complet ou la protéine visqueuse conduit inmanquablement à un résultat positif.

Le fait capital est le suivant : ces protéines sont dépourvues de toute propriété sensibilisante. Aucun des animaux préparés par injection sous-cutanée ou intracardiaque de 0 cc. 1 à 0 cc. 5 de leur solution, n'a réagi à une injection de sérum complet de protéine visqueuse ou de la solution constituant l'injection première.

La fraction solide présente, au contraire, tous les caractères anaphylactisants de la protéine visqueuse. Elle sensibilise le cobaye à elle-même et au sérum complet, elle déclanche le choc chez l'animal préparé par elle-même ou par le sérum complet.

Peut-on l'identifier à la protéine visqueuse isolée de l'euglobuline ou de la globuline par les méthodes exposées au début de ce travail ? L'étude des propriétés chimiques permet de répondre par l'affirmative. Nous pouvons dire également qu'elle réagit positivement à ces différentes catégories de protéine visqueuse et s'identifie, du point de vue anaphylactique tout au moins, avec elles.

Voici, par exemple, une expérience dans laquelle les cobayes ont été préparés par de la protéine visqueuse d'un sérum de cheval isolée de l'euglobuline de ce sérum.

Ils ont été éprouvés par l'injection intracardiaque

30 jours après, de 0 cc. 5 d'une solution isotonique de la protéine visqueuse totale isolée d'un sérum de cheval par électrolyse sèche. Tous les cobayes, au nombre de 7, ont succombés d'un choc anaphylactique type.

Voici un autre exemple : Six cobayes sont préparés par la protéine visqueuse isolée d'un sérum de cheval déjà privé de son euglobuline, c'est-à-dire par la protéine visqueuse tirée de la pseudo-globuline. Trente jours après on les éprouve par voie intracardiaque au moyen de 0 cc. 5 de protéine visqueuse totale, extraite d'un sérum de cheval par dialyso-électrolyse. Tous succombent. La protéine visqueuse isolée par dialyso-électrolyse réagit aussi bien à la protéine visqueuse de l'euglobuline qu'à celle de la pseudo-globuline et permet de penser qu'il y a identité entre les constituants visqueux des deux fractions de la globuline.

DOLADILHE et MAZILLE ont confirmé cette hypothèse en vérifiant que la protéine visqueuse de l'euglobuline sensibilise le cobaye à celle de la pseudo-globuline et vice-versa.

RÉPARTITION DES PROPRIÉTÉS ANTICORPS.

Toutes les expériences effectuées au moyen de la dialyse simple ou de l'électro-dialyse contre eau distillée, nous ont montré que les propriétés anticorps sont en majeure partie localisées dans la protéine visqueuse.

Dans un travail récent, DOLADILHE a signalé que les propriétés anticorps sont exercées par une fraction infime de cette protéine; cet auteur enlève, en effet, 90 % de la propriété visqueuse sans en diminuer la valeur anticorps.

NAUDIN a même mis au point une méthode simple et rapide pour extraire la fraction immunologique du constituant visqueux de l'euglobuline.

Nous avons été naturellement amenés à étudier l'in-

fluence exercée par notre dialyso-électrolyse sur la fraction anticorps des immunsérums. Nous avons utilisé, principalement, des sérums hémolytiques et antidiphtériques. Nous avons été très surpris de constater, dans ces deux cas, que l'anticorps, en l'espèce l'hémolysine et l'antitoxine diphtérique, se trouve en majeure partie dans la partie liquide.

La répartition de l'anticorps est donc inverse dans la dialyso-électrolyse de ce qu'elle est dans l'électro-dialyse contre eaux distillée.

Ces résultats ne sont pas contradictoires; ils peuvent trouver une explication dans les faits exposés précédemment. La propriété anticorps étant divisible de la propriété visqueuse.

L'étude de ces deux immunsérums montre que leurs anticorps sensibilisants, l'antitoxine diphtérique et l'hémolysine, se localisent dans l'homoglobuline. Pour le premier d'entre eux, on pourrait donc envisager la possibilité d'une sérothérapie intraveineuse, sans danger de choc pour le malade. Introduire directement dans le sang circulant, l'anticorps sans menacé d'accidents anaphylactiques, est évidemment d'un très grand intérêt pour le thérapeute. Théoriquement, les résultats des travaux de DOLADILHE et de MAZILLE le rendent possible. Sans parler des autres anticorps, on doit étudier, chez ces deux immunsérums, ce que deviennent, au cours de la séparation, les anticorps précipitants et agglutinants. Nous ne savons pas, en effet, si ces anticorps jouent un rôle efficace dans l'action thérapeutique de ces sérums puisque nous les injectons au malade en même temps que les anticorps sensibilisants. Il paraît donc indiqué de rechercher dans quelle fraction sérique se localisent les anticorps précipitants et agglutinants.

Dans l'impossibilité de nous procurer la toxine diphtérique, nous avons dû nous contenter d'étudier le sérum hémolytique pour lequel il nous était plus aisé (bien que les globules rouges de mouton soient assez difficiles à

trouver actuellement) de procéder à la recherche des agglutinines.

Voici la méthode expérimentale que nous avons utilisée :

Rappelons d'abord la propriété que présente un immunsérum hémolytique d'agglutiner les globules rouges avec lesquels il a été préparé, est spécifique. Dans le cas particulier du sérum hémolytique anti-mouton, cet immunsérum agglutine donc spécifiquement les globules rouges du mouton.

Le sérum de cheval qui sert à préparer l'immunsérum hémolytique de l'Institut Pasteur dont nous nous sommes servis, agglutine aussi les globules rouges du mouton. Il y a, cependant, une différence capitale entre ces deux agglutinations. C'est dans le taux de l'agglutination que réside cette différence. Le sérum hémolytique présente un pouvoir agglutinant nettement supérieur à celui du sérum de cheval. Il est donc facile, par une dilution convenable, de différencier les pouvoirs agglutinants spécifiques et naturels exercés simultanément par ce sérum. La question du taux d'agglutination étant posée (elle nous servira, d'ailleurs, plus loin, pour comparer les pouvoirs agglutinants des fractions et du sérum total), voici comment nous opérons :

Nous réalisons le phénomène d'agglutination sur plaque de microscope. Sur la plaque, on dispose une goutte de la suspension globulaire, et une goutte de la dilution sérique ou de la fraction sérique extraite du sérum. On note l'agglutination macroscopiquement. Chaque expérience d'agglutination a été faite :

1° Avec une suspension de globules rouges de mouton obtenue de la façon suivante :

On sépare par centrifugation les globules rouges de 10 cc. de sang défibriné de mouton (défibriné par agitation en présence de perle de verre aussitôt après prise de sang). On les lave dans l'eau physiologique (plusieurs

centrifugations et lavages) et on les met en suspension dans 10 cc. d'eau physiologique.

2° Avec le plasma défibriné de mouton.

Le taux d'agglutination est déterminé de la façon suivante :

Au même volume v ($1/10^e$ cc.) de la suspension globulaire ou du sang défibriné de mouton, on ajoute le même volume v de sérum anti-mouton et de dilution de plus en plus grande de ce sérum par l'eau physiologique. On note, au bout d'une heure, les numéros des plaques sur lesquels s'est produite l'agglutination.

Voici, en exemple, les résultats fournis par le lot des sérums hémolytiques de l'Institut Pasteur, qui ont servi à nos expériences (tableau) .

l représente la dilution, c'est-à-dire le volume auquel est porté un cc. de sérum par addition d'eau physiologique : (NaCl à 8 gr. 5 par litre). Les signes + ou — signifient agglutination ou pas d'agglutination; la positivité de l'agglutination évaluée par la rapidité de l'agglutination est représentée suivant sa force, par une ou plusieurs croix.

Pour comparer les pouvoirs agglutinants des fractions sériques séparées du sérum hémolytique, nous avons opéré comme suit :

Soit V^o le volume du sérum total qui sert à l'expérience.

Soit V^1 le volume représenté par l'homoglobuline (partie liquide) séparée, une fois isotonisée par l'addition du $1/10^e$ de son volume d'une solution de chlorure de sodium à 85 gr. par litre. On reprend alors le précipité (protéine visqueuse) par un volume V^1 d'eau physiologique (8 gr. 5 par litre), et on dilue un volume V de sérum total par de l'eau physiologique, de façon à l'amener au volume V^1 .

On a réalisé ainsi trois solutions équivalentes, en ce sens que : sous le même volume, elles entraînent : la

première, les protéines d'un volume V de sérum total; les suivantes, les fractions protéine visqueuse et homoglobuline de ce sérum.

En les soumettant à l'épreuve d'agglutination, on pourrait donc comparer leurs pouvoirs agglutinants.

Utilisant les mêmes notations que pour les essais faits avec le sérum total, voici les résultats obtenus pour divers lots de sérums hémolytiques.

L'étude de ces deux immunsérums montre que leurs anticorps sensibilisants, l'antitoxine diphtérique et l'hémolysine, se localisent dans l'homoglobuline. Pour le premier d'entre eux, on pourrait donc envisager la possibilité d'une sérothérapie intraveineuse sans aucun danger de choc pour le malade. Introduire directement dans le sang-circulant l'anticorps sans menace d'accidents anaphylactiques est, évidemment, d'un intérêt très grand pour le thérapeute.

Théoriquement, les résultats des travaux de DOLADILHE et de MAZILLE le rendent possible. Sans parler des autres anticorps qu'il faut soumettre à l'épreuve, on doit étudier, chez ces deux immunsérums ce que deviennent au cours de la séparation les anticorps précipitants et agglutinants.

Nous ne savons pas, en effet, si ces anticorps jouent ou non un rôle efficace dans l'action thérapeutique de ces sérums, puisque nous les injectons au malade en même temps que les anticorps sensibilisants.

Il paraît donc indiqué de rechercher dans quelle fraction sérique se localisent les anticorps précipitants ou agglutinants.

Dans l'impossibilité de nous procurer de la toxine diphtérique, nous avons dû laisser de côté le sérum anti-diphtérique, et nous contenter d'étudier le sérum hémolytique, pour lequel il nous était plus aisé (bien que les globules rouges de mouton soient assez difficiles à trou-

ver actuellement) de procéder à la recherche des agglutines.

Voici la méthode expérimentale que nous avons utilisée :

Rappelons d'abord que, la propriété que présente un immunsérum hémolytique d'agglutiner les globules rouges avec lesquelles il a été préparé est spécifique. Dans le cas particulier du sérum hémolytique anti-mouton, cet immunsérum agglutine donc spécifiquement les globules rouges du mouton. Le sérum de cheval, qui sert à préparer l'immunsérum hémolytique de l'Institut Pasteur, dont nous nous sommes servis, agglutine aussi les globules rouges du mouton. Il y a cependant une différence capitale entre ces deux agglutinations. C'est dans le taux de l'agglutination que rentre cette différence.

Le sérum hémolytique présente un pouvoir agglutinant très nettement supérieur à celui du sérum de cheval.

Il est donc facile, par une dilution convenable de l'immunsérum, de différencier les pouvoirs agglutinants spécifiques et naturels exercés simultanément par ce sérum.

La question du taux d'agglutination (elle nous servira d'ailleurs plus loin pour comparer les pouvoirs agglutinants des fractions et du sérum total) étant posée, voici comment nous opérons :

Nous réalisons le phénomène d'agglutination sur plaque de microscope. Sur la plaque on dispose une goutte de la suspension globulaire, et une goutte de la dilution sérique ou de la fraction sérique extraite du sérum. On note l'agglutination macroscopiquement. Chaque expérience d'agglutination a été faite :

1° Avec une suspension de globules rouges de mouton obtenue de la façon suivante :

On sépare par centrifugation les globules rouges de 10 cc. de sang défibriné de mouton (défibriné par agitation en présence de perles de verre, dès après la prise

de sang). On les lave dans l'eau physiologique (plusieurs centrifugations et lavages) et on les met en suspension dans 10 cc. d'eau physiologique.

2° Avec le plasma défibriné de mouton :

Le taux d'agglutination est déterminé de la façon suivante : au même volume v ($1/10^e$ cc.) de la suspension globulaire ou du sang défibriné de mouton, on ajoute le même volume v de sérum anti-mouton et de dilutions de plus en plus grandes de ce sérum par l'eau physiologique; on note au bout d'une heure les numéros des plaques sur lesquels s'est produite l'agglutination. La dilution la plus faible pour laquelle il y a agglutination représente le taux d'agglutination.

Voici en exemple les résultats fournis par le lot de sérums hémolytiques de l'Institut Pasteur, qui ont servi à nos expériences (tableau I).

l représente la dilution, c'est-à-dire le volume auquel est porté 1 cc. de sérum par addition d'eau physiologique (NaCl - 8 gr. 5 par litre).

Les signes + ou — signifient agglutination ou pas.

La positivité de l'agglutination évaluée par la rapidité de l'agglutination, est représentée, suivant sa force, par plusieurs croix.

TABLEAU I
Sérum hémolytique anti-mouton.
(Institut Pasteur.)

l	1	10	20	30	50	80	100	150
Aggluti	+++	++++	++	++	+	+	—	—

Pour comparer les pouvoirs agglutinants des fractions sériques séparées du sérum hémolytique, nous avons opéré comme suit :

Soit V^o le volume du sérum total qui sert à l'expérience.

Soit V^1 le volume présenté par l'hémoglobuline, partie liquide) séparée, une fois isotonisée par l'addition du $1/10^e$ de son volume d'une solution de NaCL à 85 grammes par litre. On reprend alors le précipité (protéine visqueuse) par un volume V^1 d'eau physiologique (8 gr. 5 NaCL %) et on dilue un volume V de sérum total par de l'eau physiologique de façon à l'amener au volume VI .

On a réalisé ainsi trois solutions équivalentes en ce sens que, sous le même volume, elles contiennent : la première les protéines d'un volume V de sérum total, les suivantes les fractions protéine visqueuse et homolytique de ce sérum.

En les soumettant à l'épreuve d'agglutination, on pourra donc comparer leurs pouvoirs agglutinants. Utilisant les mêmes notations que pour les essais faits avec le sérum total, voici les résultats obtenus, pour divers lots de sérums hémolytiques (tableaux II, III et IV).

Ce pouvoir a été étudié de la façon suivante :

a) Deux centimètres cubes d'une suspension de globules rouges de mouton, à 5 % dans l'eau physiologique, on ajoute des volumes croissants du sérum ou de sa dilution (préalablement inactivé à 55^o comme, d'ailleurs, pour les expériences d'agglutination), puis un volume V fixe d'une aléxine de cobaye (c'est-à-dire, sérum frais de cobaye) et on complète tous les tubes au même volume par addition d'eau physiologique.

TABLEAU II
Sérum hémolytique anti-mouton.

(Institut Pasteur. Lot n° 1.)

	1	10	20	50	75	100	150
Témoin	+++	+++	+++	++	+	+	—
Homoglobul. .	+	+	—	—	—	—	—
Protéine visq.	+++	++	++	+	+	—	—

TABLEAU III

Sérum hémolytique anti-mouton.
(Préparé au laboratoire sur le lapin.)

I	1	10	50	100	150	200	250
Témoin	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Homoglobul. .	+	+	—	—	—	—	—
Protéine visq.	+++	+++	+++	++	++	+	—

TABLEAU IV

Sérum hémolytique anti-mouton.
(Lot n° 3, Institut Pasteur.)

I	1	10	50	100	150	200
Témoin	+++	+++	+++	++	+	—
Homoglobul. .	+	+	—	—	—	—
Protéine visq.	+++	+++	++	++	+	—

On place à l'étuve à 37° et on observe au bout de combien de temps se produit l'hémolyse.

Les tableaux suivants donnent les résultats obtenus avec les sérums des lots 1, 2 et 3, pour lesquels nous avons donné les résultats d'agglutination.

l indique pour chacun d'eux le volume en cc. du témoin de l'homoglobuline ou de la protéine visqueuse ajouté à 2 cc. de la suspension de globules rouges. Dans chaque cas, le volume de sérum de cobaye ajouté a été de 1/10° de cc.

Les chiffres indiquent au bout de combien de temps se produit l'hémolyse totale (tableaux V, VI et VII).

TABLEAU V

(Lot n° 1.)

I	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Témoin	1 h. 30	1 h. 15	1 h.	40 m.	30 m.	25 m.	25 m.
Homoglobul. .	2 h.	1 h. 30	1 h. 15	1 h.	55 m.	50 m.	40 m.
Protéine visq.	hémolyse partielle			2 h.	1 h. 30	1 h. 10	1 h.

TABLEAU VI

(Lot n° 2.)

I	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Témoin	1 h.	55 m.	40 m.	25 m.	15 m.	15 m.
Homoglobul. .	1 h. 30	1 h.	50 m.	30 m.	20 m.	20 m.
Protéine visq.	hémolyse partielle		1 h. 30	1 h.	50 m.	45 m.

TABLEAU VII

(Lot n° 3.)

I	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Témoin	1 h. 50	1 h. 30	1 h.	50 m.	40 m.	30 m.	25 m.
Homoglobul. .	hémolyse partielle		1 h. 30	1 h.	50 m.	35 m.	30 m.
Protéine visq.	pas d'hémolyse		hémolyse partielle		2 h.	1 h. 30	1 h.

Ainsi, il semble exister une nette différence entre la teneur en anticorps agglutinant et sensibilisant de l'homoglobuline et de protéine visqueuse. La première est riche en sensibilisatrice mais pauvre en agglutinine; la seconde, au contraire, pauvre en sensibilisatrice, est riche en agglutinine. L'une est anaphylactisante, l'autre ne l'est pas. Qu'en conclure ?

Toute conclusion est impossible. Nous n'avons pas le droit d'envisager d'autre conclusion que l'exposé de nos résultats. Nous nous reconnaissons, cependant, à la merci d'expériences en cours fondés, de faire une hypothèse qui ne concerne, évidemment, que le cas très particulier du sérum hémolytique anti-mouton.

La d'alyso-électrolyse nous a permis de séparer des protéines sériques en deux fractions, protéine visqueuse et homoglobuline qui, par leurs caractères physiques et biologiques, se sont révélées différentes. Nous en avons déduit qu'elles possédaient, l'une et l'autre, leur personnalité physico-chimique et biologique. Nous sommes arrivés à la même conclusion qu'HOFMEISTER et son école,

lorsqu'ils ont affecté à la globuline et à l'albumine, une personnalité physico-chimique, un titre de constituant sérique.

Les immunologistes, d'autre part, démontrent que c'est dans la pseudoglobuline que se trouvent les anticorps et affectent ainsi, à cette fraction de la globuline, une personnalité que nul, jusqu'ici, n'a osé nier.

Un écueil, cependant, s'oppose à ce raisonnement. L'anaphylaxie ne permet pas de différencier la pseudoglobuline de l'albumine et de l'euglobuline.

L'une des trois réagit à l'autre :

L'introduction de la protéine visqueuse et de l'homoglobuline comme constituants de ces protéines faite par DOLADILHE puis par MAZILLE, apporte une première lueur grâce à la différenciation anaphylactique.

Les expériences de ces auteurs, du point de vue anticorps, sont moins satisfaisantes et aussi trop peu nombreuses.

La protéine visqueuse et l'homoglobuline sont bien différenciées anaphylactiquement, elles ne le sont pas si nettement du point de vue anticorps.

Nos modestes expériences le prouvent.

L'anticorps agglutinant se répartit entre les deux, en sens inverse, il est vrai, du sensibilisant.

Nous sera-t-il permis de faire une hypothèse longuement mûrie au laboratoire, en compagnie de notre directeur et amis, le professeur DOLADILHE ?

Ces répartitions inégales peuvent s'expliquer de deux manières : ou bien les anticorps sont des substances autonomes qui s'allieraient au gré des circonstances avec l'une ou l'autre protéine (la visqueuse ou l'homoglobuline), hypothèse peu probable.

Ou bien les anticorps seraient unis à l'homoglobuline, c'est-à-dire à la protéine non anaphylactisante, mais la protéine visqueuse isolée par dialyso-électrolyse comme

celle isolée par les autres méthodes, ne serait pas pure, mais contiendrait une certaine quantité d'homoglobuline, indécélable par anaphylaxie, puisqu'elle est anaphylactiquement inerte.

La vérification de cette hypothèse, que quelques expériences en cours permettent d'espérer, apporterait une contribution importante au problème de la sérothérapie intraveineuse, puisqu'elle permettrait d'espérer obtenir la protéine anticorps non anaphylactisante.

CONCLUSIONS

1° La séro-globuline et la séro-albumine sont constituées par des mélanges complexes qu'on peut scinder en deux fractions protéiques :

La protéine visqueuse et
l'Homoglobuline.

2° Les protéines sériques totales peuvent, à l'image de la globuline et de l'albumine, se scinder en deux parties :

La protéine visqueuse et
l'Homoglobuline.

3° L'homoglobuline apparaît, d'après les travaux antérieurs, comme : 1° dépourvue de propriété anaphylactisante; 2° sert de support à quelques anticorps protecteurs comme l'antitoxine diphtérique.

Elle semble donc représenter une purification idéale de sérum thérapeutique.

4° Aucune recherche n'a été faite sur la localisation des anticorps précipitants ou agglutinants.

5° Notre travail tend à montrer que l'anticorps agglutinant du sérum hémolytique se concentre, non pas sur l'homoglobuline, mais sur la protéine visqueuse,

6° Nos expériences réalisent la séparation des deux anticorps du sérum hémolytique sensibilisatrice et agglutinine, dont le premier se concentre dans l'homoglobuline et le second dans la protéine visqueuse.

Vu,
Le Doyen :
BAUDOUIN

Vu,
Le Président de Thèse :
LOEPER

Vu et Permis d'Imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris :
G. GIDEL.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARD, GRIGAÛT et CODOUNIS. — Les variations pathologiques de la composition protéinique du sérum sanguin. *Bull. de la Soc. de Chim. Biol.*, 1930. T. 12, n° 4, page 417.
- ACHARD, LEVY et GALLAIS. — Etudes expérimentales des changements colloïdaux produits dans le sérum du sang par l'injection de sérum concentré et de plasma. *C. R. Acad. des Sc.*, 1932. T. 194, pages 1.773-1.777.
- ARLOING et LANGERON. — L'anaphylaxie dans la série animale. *C. R. Soc. Biol.*, 1922. T. LXXXII, page 632.
- ASHER. — Untersuchungen über die physiologische Permeabilität der Zellen. *Biochem. Zeitschr.*, 1908. T. XIX, page 1.
- BAURMANN. — Vergleichende Messungen des Elektrolytegehaltes von sérum. *Bio. Deutsch opt. Ges.*, 1929, pp. 157-169.
- BERNHARD (A.) et BEAVER (J. J.). — The électrodialysis of human blood serum. *Journal Biol. Chem.*, 1926. T. LXIX, pages 113-124.
- BESREDKA. — Etudes sur l'anaphylaxie. Coagulation et purification du sérum. *Annales de l'Institut Pasteur*. T. XXXVII, page 935.
- Du mécanisme de l'anaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1908. T. XXII, page 496.
- BESREDKA et STEINHART. — De l'anaphylaxie et de l'anti-anaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval. *Ann. de l'Inst. Pasteur*. T. XXI, pp. 117 et 217.
- BETHE (A.) et TOROPOFF (T.). — Über elektrolische Vorgänge an Diaphragmen. *Zeitschr. f. phys. chem.*, 1914. T. 88, p. 686. T. 89, p. 597, 1915.

- BORDET. — Traité de l'immunité. Masson, éditeur, Paris, 1920, p. 391.
- Mécanisme de l'agglutination. Annales del 'Inst. Pasteur, 1899. T. XIII, p. 248.
 - Immunité, Antigènes, Anticorps. Traité de Physiologie de Roger. T. VII, p. 329.
 - Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines. Annales Inst. Pasteur, 1900. T. XII, p. 257.
 - Les propriétés des antisensibilisatrices et les théories chimiques de l'immunité. Ann. Inst. Pasteur, 1904. T. XVIII, p. 593.
 - Les théories actuelles de l'anaphylaxie. C. R. Ac. des Sc., T. CLXXIX, p. 243.
- BOUTARIC. — Les colloïdes et l'état colloïdal. 1931. Alcan, édit. (252 pages).
- BORDET et GENGOU. — Recherches sur la coagulation du sang et les sérums anticoagulants. Ann. Inst. Pasteur, 1901. T. XV, p. 129.
- BUGARSKY et TANGL. — Physikalisch-chemische Untersuchungen über die molekularen Konzentrations-verhältnisse des Blutserums. Pflügers Arch., 1898. T. LXII, pp. 531-533.
- CALMETTE (A.). — Contribution à l'étude des sérums, des toxines et des sérums antitoxiques. Ann. Inst. Pasteur, 1895. T. IX, p. 225.
- CHANOZ (M.) et PONTIUS (P.). — Quelques recherches physico-chimiques sur le sérum diversement traité. C. R. Soc. de Biologie, 1923. T. CXII, p. 883.
- CHARPENTIER, DOLADILHE et Charles MOREL. — Sur la propriété anticorps de la protéine visqueuse des sérums hémolytiques anti-mouton. C. R. Acad. des Sc., 1937. T. CCIV, p. 451. T. CXXV, p. 700.
- CHARPENTIER, DOLADILHE, MOHEL et PLACIDI. — Localisation de l'agglutination dans la protéine visqueuse. C. R. Soc. Biol., 1937. T. CXXVI, p. 557.
- CHICK (H.). — The factors concerned in the solution and precipi-

- tation of euglobuline. The Biol. Chemical Journal, 1913. T. VII, p. 318.
- CLUZET (J.). — Viscosité, conductibilité électrique et indices photométriques du sérum sanguin acidifié. C. R. Soc. de Biol., 1929. T. C, p. 1.039.
- CUSHNY (A. R.). — The colloid, free filtrate of serum. Journ. of Physiol., 1919-1920. T. LIII, pp. 391-398.
- DEAN. — The reaction of isamine blue with serum. The Journ. of Pathol. and Bacteriol., 1937. T. XLV, p. 745.
- DHÈRE. — Quelques observations sur la préparation et les propriétés des sérums déminéralisés. C. R. Soc. de Biol., 1911. T. LXX, p. 42.
- La dialyse électrique en biochimie. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 1926. T. VIII, p. 144.
- DHÈRE et GORGOLEWSKY. — Sur l'obtention par dialyse électrique d'un sérum extrêmement appauvri en électrolytes. C. R. des Sciences, 1910. T. CL, p. 993.
- DIEUZAIDE (R.). — Résistivité électrique des liquides de l'organisme. Thèse Paris, 1904 (150 pages).
- DIACONO. — L'hémolyse. Maloine, Paris, 1934 (427 pages).
- DOLADILHE. — Recherches sur certaines propriétés physiques des sérums sanguins. Ann. de l'Inst. Pasteur, octobre 1934. T. LIII, p. 379.
- Sur quelques propriétés physiques du sérum sanguin. C. R. Acad. des Sc., 1934. T. CXCVIII, p. 1.189.
- Nouvelles observations sur les propriétés physiques du sérum sanguin. C. R. Acad. des Sc., 1934. T. CXCVIII, p. 1.884.
- Recherches sur le pouvoir complémentaire des sérums sanguins. C. R. Acad. des Sc., 1934. T. CXIX, p. 539.
- Sur une propriété physique d'un des constituants de la fraction non dialysable d'un sérum sanguin. C. R. Acad. des Sc., 1936. T. CCIII, p. 1.295.
- Sur la dissociation de la globuline en deux constituants nettement différenciés : l'homoglobuline et la protéine vis-

- queuse. Annales de l'Inst. Pasteur, décembre 1937. T. LIX, page 624.
- Contribution à l'étude d'un des constituants des acido-globulines : la protéine C. C. C. R. Ac. des Sc., 1936. T. CCII, page 1.385.
 - Sur les relations entre l'alexine et la protéine visqueuse du sérum. C. R. Acad. des Sc., 1937. T. CCIV, page 382.
- DOLADILHE et MAZILLE. — Séparation de la globuline du sang et isolement de la protéine visqueuse. C. R. Soc. de Biol., 1938. T. CXXIX, page 388.
- In-vitro, un seul constituant de l'édifice protéosérique fixe les matières colorantes. C. R. Soc. de Biol., 1939. T. CXXX, page 128.
 - Sur la purification de la protéine visqueuse d'un immun-sérum. C. R. Soc. de Biol., 1939. T. CXXX, page 1.116.
 - Sur le comportement de quelques matières colorantes colloïdales électronégatives introduites directement dans le sang circulant. C. R. Soc. de Biol., 1939. T. CXXX, p. 1.118.
 - Sérums chauffés et sérums non chauffés. C. R. Soc. de Biol., 1939. T. CXXXI, p. 752.
- DOLADILHE et Charles MOREL. — Contribution à l'étude de l'influence exercée par l'alexine sur la dispersion d'un complexe colloïdal par un sérum sanguin. C. R. Acad. des Sc., 1936. T. CCIII, p. 1.102.
- DONGIER et LESAGE. — Valeurs de la résistance électrique, de l'indice de réfraction et du pouvoir rotatoire des sérums sanguins normaux. C. R. Acad. des Sc., 1902. T. CXXXIV, page 834.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. — Contribution à l'étude du phénomène anaphylactique. Thèse Paris, 1929 (127 pages).
- L'immunité par mécanisme physico-chimique. Masson, Paris, 1934, pages 49-73.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et Etienne ROUX. — Recherches sur les sérums sanguins. Ann. Inst. Pasteur, 1925. T. XXXIX, p. 368. C. R. Soc. Biol., 1926. T. CXLIX, p. 244.

- DUJARRIE DE LA RIVIÈRE et KOSSOVICH (N.). — Antigènes, hétéro-antigènes et haptènes. Paris, 1937, Baillères et Fils, édit. (pages 20 à 50.)
- ERLICH (P.). — Ueber Immunitat durch Vererbung und Säugung. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh., 1892. T. XII, p. 184.
- ETTISCH (G.) et BECK (W.). — Zur Frage der Fraktionierung der Proteine. I. Die Dialysefällung. Biochem. Zeitschr., 1926. T. CLXXII, pages 1-9.
- ETTISCH (G.), BRADFIELD (A.) et EWWIG (W.). — Zur Frage der Elektrodialyse des serums. Kolloid Zeitschr., 1938. T. 45, pages 141-145.
- EWIG (W.) et ETTISCH (G.). — Zur Frage der Serumfraktionierung mittels Elektrodialyse. Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 1928, p. 460.
- FERRATA. — Die Enwirksamkeit der Komplexen Hamolysine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache. Berl. Klin. Wochenschr., 1907, T. XLIV, page 366.
- FREUNDLICH et LOEB (F.). — Ueber Elektrodialyse. Biochem. Zeitschr., 1924. T. CL, p. 552.
- FULD (E.). — Über die Vorbedingungen der Blutgerinnung sowie über die Gerinnbarkeit des Fluorplasmas. Centralbl. f. Phy., 1903, p. 529.
- GAY (F. P.) et ADLER (H. M.). — On the chemical separation of the sensitizing fraction (anaphylactin) from horse. Jour. of Med. Research, 1908. T. XVIII, p. 433.
- GUERARD (P.) et LOURAU (M.). — Electrophorèse des sérums hémolytiques et agglutinants. R. C. Soc. de Biol., 1934. T. CXVI, page 1010.
- GOTTSWALL (E.). — Über die Filtration von Eiweißlösungen durch tierische Membranen. Zeitschr. f. Physiol. Chem., 1880. T. IV, p. 429.
- GURBER. — Die Salze des Blutes. Sitz. ber. phys. med. Gesell. zu Würzburg, 1894. T. XXVIII, p. 129.
- HALLIBURTON. — The proteides of serum. The Journ. of Phys. T. V, p. 158. T. VI, p. 317.

- HAMMERSTEN. — Lehrbuch der physiologischen chemie Wiesbaden, 1899, p. 507.
- HARDY. — Colloidal solution. The globuline. Journ. of Phys., 1905-1906. T. XXXIII, pages 251-337.
- HAYEM. — Du sang et de ses altérations anatomiques. Paris, 1889.
- HERARD. — Recherches sur les sérums sanguins; application au sérum antidiphthérique. Thèse médecine, Clermont-Ferrand, 1939 (36 pages).
- HEYMANN (L.). — Dialyse und Ultrafiltration. Elektrodialyse und Elektroultrafiltration, ein Vergleich. Zeitschr. f. Phys. Chem., 1925. T. CXVIII, p. 65.
- HIRSCH (G. F.) et EWIG (W.). — Zur Elektrodialyse des Serums. Zeitschr., avril 1928. T. CXCV, pages 175-188.
- HIRTÁ et TSCHIMBER (C.). — Technique de l'ultrafiltration du plasma, détermination du pH, du Ca, Mg, Na et du P dans l'ultrafiltrat. C. R. Soc. de Biol., 1924. T. XCI, p. 592.
- HO DAC HAN. — Contribution à l'étude des protéines sériques et en particulier de Myxoprotéine. Librairie Le François, 1933 (160 pages).
- HOFMEISTER. — Scheidung der Serumbestandteile durch die Salz-methode. Arch. f. exp. Path. u. Phar., 1888-1890. T. 24, 25, 26, 27, 28.
- LASCH et REISSTOTTER. — Berichtigung zu unserer Arbeit; zur physikalisch, chemischen, Kennzeichnung von normalen und pathologisch veränderten Blutserum und Beberkungen zu « Elektrodialyse und elektroosmose von Reiner ». Biochem. Zeitschr., 1928. T. CXIX, pages 216-217.
- LASSEUR-GIRARDET et VERMEIN. — Variations de la conductibilité électrique des sérums avec la dilution. Bull. Soc. Chim. Biol., 1925. T. VII, p. 401.
- LECOMTE DE NOUY. — La conductivité du sérum en fonction de la température. Ann. Inst. Pasteur, 1933. T. L, n° 1, p. 127.
- LEGRABD (P.-P.). — Sur les constituants du sérum sanguin : la protéine visqueuse et l'homoglobuline. Bull. de Biol. Phar., 1937, n° 36, I et trim. (4 pages).

- LOCKE et HIRSCH. — The fractionation of isoelectric amboceptor pseudoglobulin by electrodialysis. *Journ. of inf. diseases*, 1924. T. XXXV, p. 519.
- LOEB. — On the diffusibility of the calcium of blood serum through collodion membranes. *Journ. gen. Physiol.*, 1923-1924. T. VI, pages 453-456.
- LUMIÈRE (A.). — Contribution à l'étude des sérums. *C. R. Acad. des Sc.*, 1924. T. CLXXVI, p. 790.
- LUMIÈRE (A.) et MEYER (P.). — Caractéristiques colloïdales de la réaction de floculation anaphylactique. *C. R. Soc. de Biol.*, 1934. T. CXXVI, p. 1.008.
- MARCUS EMIL. — Ueber in Masser loslicher Serumglobulin. *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, 1899. T. XXVIII, p. 559.
- MARSHALL. — Studies on haemolysis with special reference to the blood and bodyfluids of human beings. *The Journ. of experim. médecine*, 1901. T. VI, p. 347.
- MASTUMURA. — Ueber die Reaktion der Protein mitseifen und fettsäuren Kolloid *Zeitschr.* 1923. T. XXXII, p. 173.
- MAZILLE. — Analyse anaphylactique de l'euglobuline. Thèse Université de Dijon, 1938 (48 pages).
- Sur une dialyse électrique irréversible et sèche du sérum sanguin. *C. R. Acad. des Sc.*, 1938. T. CCVI, p. 379.
 - Sur une électrodialyse unipolaire du sérum sanguin. *C. R. Acad. des Sc.*, 1938. T. CCVII, p. 1.135.
 - Sur le problème de la dissociation des propriétés séro-anaphylactiques et anticorps. *C. R. Acad. des Sc.*, 1940. T. CCX, pages 65-66.
- MELLAMBY. — The physical properties of horse serum. *J. of Phys.*, 1906-1907. T. XXXV, p. 473.
- MESTREZAT (W.) et LEBETH. — Des dialysats du sérum équilibrés in-vitro. Le rôle compensateur des chlorures. *C. R. Soc. de Biol.*, 1921. T. LXXXV, p. 55.
- MEYSENBUG, PAPPENHEIMER, ZUCKER et MURRAY. — The diffusible calcium of the blood serum I. A. method for its determination. *Journ. of Biol. Chem.*, 1920. T. XLVII, p. 529-539.

- MOSERN et PAULY. — Untersuchungen des elektrolytfreien Wasserloslichen Proteinen. Biochem. Zeitschr., 1925. T. CLVI, p. 482.
- MOREL. — Mécanisme des floculations non spécifiques en sérologie. Influence de l'alexine sur la séro-dispersion des complexes non spécifiques. Thèse Dijon, 1937 (100 pages).
- MOREL (C.). — De l'influence de l'alexine sur le pouvoir défloculant du sérum sanguin. C. R. Soc. de Biol., 1936. T. CXXXII, p. 254.
- MUTZENBECHER (Von). — Untersuchung der bei Serum elektrodiolyse auftretenden Eiweiszfraktionen mitder Ultrazentrifuge. Biochem. Zeitschr., 1931. T. CCXXXV, pages 425-437.
- NAUDIN. — Sur une méthode de purification de l'euglobiline du sérum hémolytique. Thèse médecine Lyon, 1939 (44 pages).
- NEUHAUSEN (B. S.) et PINCUS (J. B.). — A studie of the condition of several inorganic constituents of serum by means of ultrafiltration. Journ. of Biol. Chem., 1923. T. LVII, p. 99.
- NICOLLE (M.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets. Ann. Inst. Pasteur, 1908. T. XXII, p. 237.
- NICOLLE (M.), CESARI et DEBAINS (E.). — Etude sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes (1^{er} mémoire). (Sérums, antisérums). Ann. Inst. Pasteur, 1920, T. XXXIV, p. 149.
- NISTCHKE. — Über das volumen der Eiweiskörper imserum. Arch. f. experimentelle Pathologie und Pharmacologie, 1926. T. CXV-CXVI, page 134.
- OTTO (R.). — Zür Frage der serum Ueberempfindlichkeit. Münch. med. Woch., 1907. T. LIV, p. 1.665.
- PASTEUR-VALLÉRY-RADOT, G. MAURIC et Mme A. HUGO (Holtzer). — L'anaphylaxie. Masson, édit., 1937 (pages 15 à 167).
- PAULI (W.). — Die Elektrodialyse. Biochem. Zeitschr., 1924. T. CLIII, p. 504.
- PIARD. — La gélification plasmatique irrétractile. Thèse médecine Clermont-Ferrand, 1939 (42 pages).
- PICK et YAMANOUCHI. — Chemische und experimentelle Beiträge

- zum studium der Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immun. forsch. u. exper. Therap., 1909. T. I, p. 676.
- PIETTRE et VILA. — Séparation des protéines du sérum. Comptes rendus. T. CLXX, 1920, p. 1.466; 1920, T. CLXX. Bulletin de la Soc. de Chimie Biologique, 1921. T. III, p. 483.
- PIETTRE. — La méthode à l'acétone permet de localiser dans la sérumalbumine l'hémolyse d'un immunsérum hémolytique. R. C. Acad. des Sc., 1926. T. CLXXXII, p. 1.051.
- Sur quelques propriétés de la sérumalbumine. C. R. Acad. des Sc., 1929. T. CLXXXVIII, p. 463.
- Du rôle des non-électrolytes dans la stabilité des milieux biologiques. R. C. Acad. des Sc., 1930. T. CXC, p. 1.012.
- Biochimie des protéines. Baillières, édit., Paris, 1937 (370 pages).
- PLACIDI et Ch. MOREL. — Recherches sur les sérums sanguins. C. R. Soc. de Biol., 1937. T. CXXV, p. 234.
- POLH. — Das Arbeiten mit Organeiweiss. Abferhalden's Handbuch. der Biol. Arb., 1922. T. I, p. 8.
- PORGES et SPIRO. — Die globuline des Flutserums Hofmeister Beitrag. Z. Chem. Phys. u. Path., 1903. T. III, p. 277.
- PORIER et Ch. RICHT. — Action anaphylactique de certains venins. Bull. Soc. Biol., 1902. T. LIV, p. 170.
- RAMON. — Sur l'immunité antitoxique. Son existence, son mécanisme. Revue d'Immunologie, 1936. T. II, p. 305.
- REINER (L.) et KOPP REINER (H.). — Zur Frage der Isolierung und Bestimmung des Serumglobulins mittels Elektrodialyse. Kolloid. Zeitschr., 1928. T. XLVI, p. 99.
- REITSTOTTER. — Kolloidchemische Kennzeichnung der einzelnen Eiweiszfraktionen von seren. Oesterreichische Chemiker Zeitung, 1922. T. XXV, p. 29.
- RICHT. — L'anaphylaxie. Alcan, édit., 1902 (345 pages).
- RICHTER-QUINTTER (M.). — Le potassium dans l'ultrafiltration du sérum sanguin. C. R. Soc. de Biol., 1924. T. XCI, p. 594.
- RINGER (W. E.). — Eiweisz und Natrium und Kallumionen. Zeitschr. f. Phys. ch., 1923. T. CXXX, p. 270.

- Eiweisz und Kaliumionen. Zeitschr. f. phys. ch., 1923. T. CXIV, p. 94.
- ROCHE (Mme A.). — Sur les propriétés physico-chimiques de la fraction des globulines du sérum et du plasma précipitable par acide acétique.
- RONA. — Ueber das Verhalten des chlores im serum. Biochem. Zeitschr., 1910. T. XXIX, pages 501-508.
- RUPPEL (W.). — Das Verhalten von Eiweisz und antitoxin gegenüber dem elektrischen Strom. Berichte d. D. Pharmaceut. Gesell., 1920. T. XXX, p. 314.
- RUPPEL (W. G.), ORNSTEIN (O.), CARL (J.) et LASCH (G.). — Lyophile und lyophobe Eiweiskörper absättigen und antikörper. Zeitschr. f. Hyg., 1922. T. XCVII, p. 188.
- SACHS et ALTMANN. — Die « Hydrolabilität » des komplements und ihre Ursachen. Biochem. Zeitschr., 1916. T. LXXVIII, p. 46.
- SENG. — Ueber die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweiskörper im Diphtherie-Serum. Zeitschr. f. u. infekt., 1899. T. XXXI, p. 513.
- SORENSEN. — The solubility of preteins. Journ. Amer. Chem. Soc., 1925. T. XLVII, p. 457.
- SPIEGEL-ADLER (M.). — Goldsol und Proteine. Biochem. Zeitschr., 1927. T. CLXXX, p. 395.
- STERN. — Ueber den Mechanismus der serologischen Luesreaktionen. Zugleich ein Beitrag zur weiteren Kennzeichnung der Eiweiszfraktionen des menschlichen Blutserum. Biochem. Zeitschr., 1924. T. CXLIV, p. 115.
- TURRO (R.), GONZALEZ (P.). — Anaphylaxie par les globulines. C. R. Soc. Biol., 1910. T. LXIX, pages 372, 451, 598.
- TZANCH. — La transfusion sanguine.
- VERNES. — Sur la précipitation d'un colloïde organique par le sérum humain. C. R. Acad. des Sc., 1918. T. CLXVI, p. 575.
- VERNES (A.), BRICQ et YVON. — L'enchaînement des faits depuis la naissance de la sérologie jusqu'au photomètre. Arch. Inst. Prophylactique, 1929. T. I, n° 4, p. 267.

- WAELE (H. DE). — Contribution à l'étude de l'anaphylaxie. Bull. Acad. roy. de Méd., Bruxelles, 1907. T. XXI, p. 715.
- WELTMANN (O.) et KLINESCH (E.). — Beitrag zur physikalischen Chemie des serums. Zeitschr. f. de ges. exp. Med., 1924. T. XLIII, p. 626.
- WERNICKE (R.). — Electrodialysis del suero antidifterica de caballo. Annales de la Association quimicina argentina, 1922. T. X, p. 309.
- Application de l'électrodialyse au dosage des bases totales du sérum sanguin. C. R. Soc. de Biolog., 1923. T. LXXXIX, p. 748.
- WEIL. — Studie on anaphylaxis. Journ. of med. Research, 1914, p. 87.
-

IMPRIMERIE R. FOULON

29, Rue Deparcieux, 29

P A R I S
